

論 文 内 容 要 旨

無血清培養系でのlymphokine-activated killer 細胞の細胞障害活性誘導
に及ぼすインスリン及びコレステロール合成阻害剤の影響

主指導教員：岡本 哲治 教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：杉田 誠 教授

(医歯薬保健学研究科 口腔生理学)

三島 健史

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

研究目的

コレステロールなどの脂質は生体膜の主要構成成分であると同時に、脂質や脂質代謝産物がさまざまな生理活性を有する生理活性脂質として機能し、脂質の異常が、生活習慣病、免疫性疾患、癌などの原因となることが知られている。さらに近年、免疫応答においても生理活性脂質が重要な役割を果たすことが報告され、リンパ球やマクロファージなどの免疫細胞の機能が脂質の細胞内代謝によって制御されていることが明らかにされつつあるがその詳細は不明な点が多い。

申請者の所属する研究室では、インスリンが、lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の障害活性の誘導を抑制することを報告し、インスリンを含まない無血清培地で誘導したLAK細胞を用いて、口腔癌の細胞治療に応用してきた。

本研究では、インスリンがLAK細胞の細胞障害活性を抑制する機序について明らかにすることを目指した。まず、インスリンがLAK細胞のコレステロール代謝系に影響を及ぼすことにより細胞障害活性を制御しているという仮説に基づき、無血清培養系を用いて、コレステロール生合成の阻害剤のLAK細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼす影響を検討し、さらにインスリンのLAK細胞におけるコレステロールエステル化に及ぼす影響について解析を行った。

研究方法

LAK細胞は、健康人ボランティアから末梢血を採取し、Ficoll-Conray比重遠心法を用いて末梢血リンパ球 (Peripheral blood lymphocytes : PBL) を分離し、無血清培地 (RD4F : RPMI1640 と Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を1:1に配合した培地 (RD) にヒトトランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-アミノエタノール、亜セレン酸ナトリウムを添加) にinterleukin-2 (IL-2) を加えた無血清培地に、インスリン、Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) あるいはInsulin-like growth factor 2 (IGF-2) を種々の濃度で添加し7日間培養することでLAK細胞の誘導を行った。誘導したLAK細胞の細胞障害活性試験は、扁平上皮癌細胞株A431細胞を標的細胞とした4時間の ^{51}Cr 遊離試験法で行い、%細胞障害活性を算出し、評価した。LAK細胞における免疫チェックポイント分子Programmed cell death 1 (PD-1) 発現に及ぼすインスリンの影響は、定量PCR法及びウェスタンブロット法で解析した。

コレステロール合成阻害剤として、ファルネシル2リン酸合成酵素阻害剤であるZoledronic Acid、コレステロール生合成の律速酵素であるHMG-CoA-reductase阻害剤Lovastatin、7-デヒドロコレステロール還元酵素阻害剤AY9944、デスモステロール還元酵素阻害剤Triparanolの細胞障害活性の誘導に及ぼす影響を検討した。

インスリンのLAK細胞の脂質合成への影響を明らかにするために、 $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ acetate の脂質画分への取り込みを指標に検討した。脂質の抽出は、Bligh & Dyer法で行い、各脂質は、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いてhexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:2) の溶媒系で分離し、各画分の放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。

さらに、コレステロールエステルへの変換酵素であるcholesterol acyltransferase (ACAT) に及ぼすインスリンの影響を明らかにするために、インスリン存在下及び非存在下でのACAT遺伝子及び蛋白発現を定量PCR法及びウェスタンブロット法で解析するとともに、[1-¹⁴C] Oleic acid の各脂質画分への取り込みを指標としてACAT活性を算出した。また、ACAT阻害剤であるAvasimibeのLAK細胞の細胞障害活性及びPD-1遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

結果

1. 無血清培養下、インスリン、IGF-1及びIGF-2は非添加条件と比較し、LAK細胞の細胞障害活性を有意に抑制したが、PD-1遺伝子及び蛋白発現を亢進した。
2. Lovastatin, AY9944及びTriparanolなどのコレステロール合成阻害剤は、LAK細胞の細胞障害活性を濃度依存的に抑制した。AY9944ならびにTriparanolの細胞障害活性の抑制効果は、Lovastatinのそれと比較し高いことが明らかとなった。
3. Zoledronic Acidは、1～5μMの低濃度では細胞障害活性を増強したが、高濃度では抑制した。
4. AY9944ならびにTriparanolは、PD-1遺伝子発現を濃度依存的に亢進した。
5. インスリンは、LAK細胞における遊離コレステロールの比率を低下させた。
6. インスリンは、ACAT遺伝子・蛋白発現及びACAT活性を有意に増強した。また、ACAT阻害剤であるAvasimibeは、インスリンによるLAK細胞の細胞障害活性の誘導を抑制した。

考察

Zoledronic Acid, Lovastatin, AY9944 及び Triparanol などのコレステロール合成阻害剤は LAK 細胞の細胞障害活性の誘導を抑制することが明らかとなった。さらに、インスリン、IGF-1 及び IGF-2 による LAK 細胞の細胞障害活性の抑制機序は、インスリンが LAK 細胞の ACAT 活性を誘導することで、遊離コレステロールのエステル化が促進され、遊離コレステロールが減少することによって考えられた。したがって、細胞膜の遊離コレステロール量は LAK 細胞の細胞障害能に重要な機能を果たしていることが考えられ、免疫細胞のコレステロール代謝をターゲットとした癌免疫療法の有用性が考えられた。